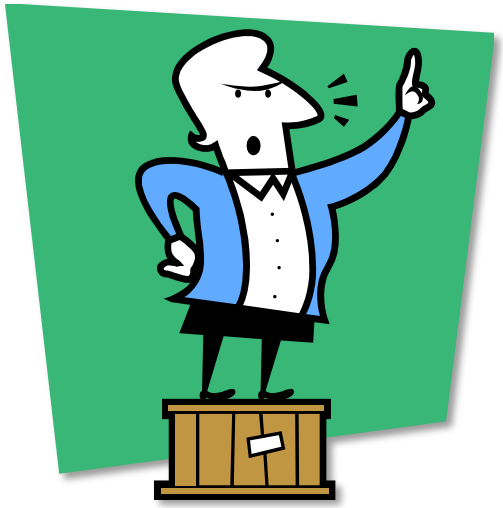
Thema der Vorlesung



Zell-Zellkommunikation

Vibrio als Gattung und Modellorganismus

Quorum Sensing

Vibrio alginolyticus
Vibrio cholerae
Vibrio fischeri
Vibrio harveyi
Vibrio natriegens
Vibrio parahaemolyticus
Vibrio vulnificus
(Vibrio; kein Enterobakterium)

Die Cholera in Hamburg 1892
mit ca.16.000 Erkrankten, von denen 8.000 starben

Bekanntmachung.

Vor dem Genuß ungekochter Speisen, namentlich ungekochten Elb- und Leitungs-Wassers sowie ungekochter Milch wird dringend gewarnt.

Hamburg, den 1. September 1892.

Die Cholera-Commission des Senats.

Cholera wird verursacht durch verunreinigtes Trinkwasser.
Letzer großer Cholera-Ausbruch in Haiti 2010 mit ca. 500.000 Infizierten
...derzeit Südsudan, Nigeria

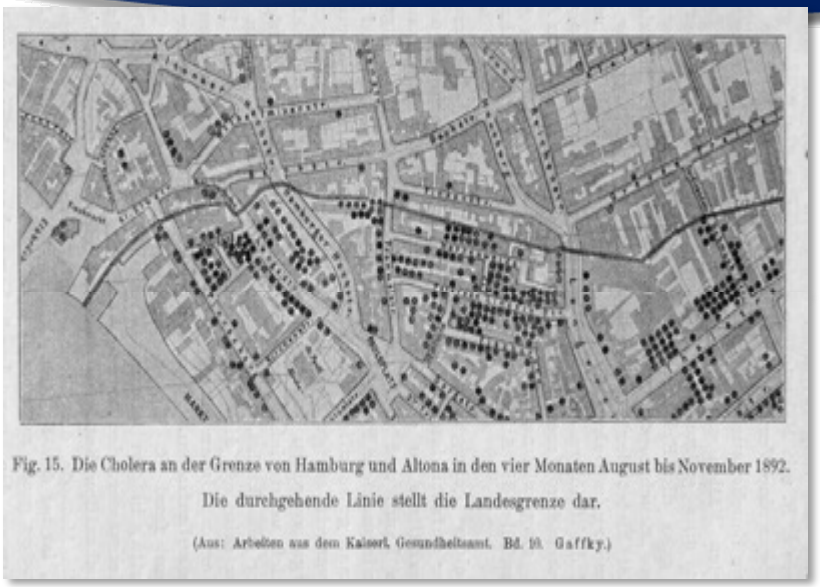
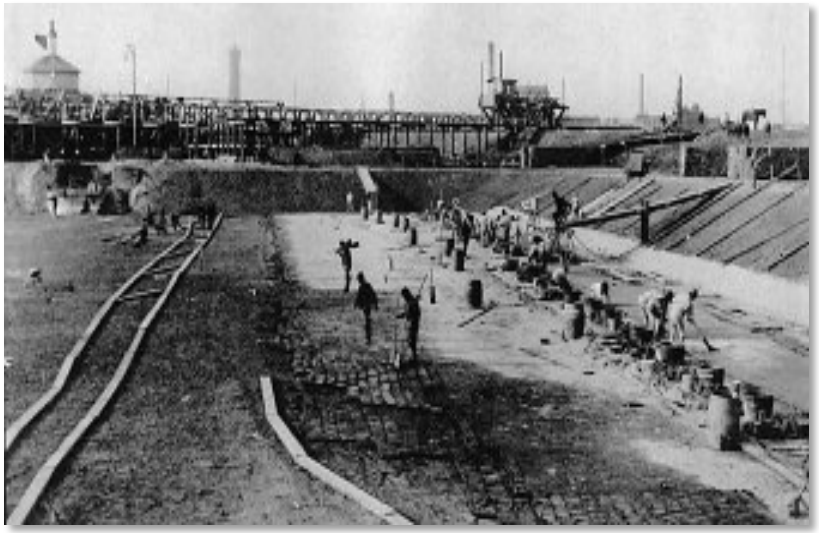


Fig. 15. Die Cholera an der Grenze von Hamburg und Altona in den vier Monaten August bis November 1892. Die durchgehende Linie stellt die Landesgrenze dar.

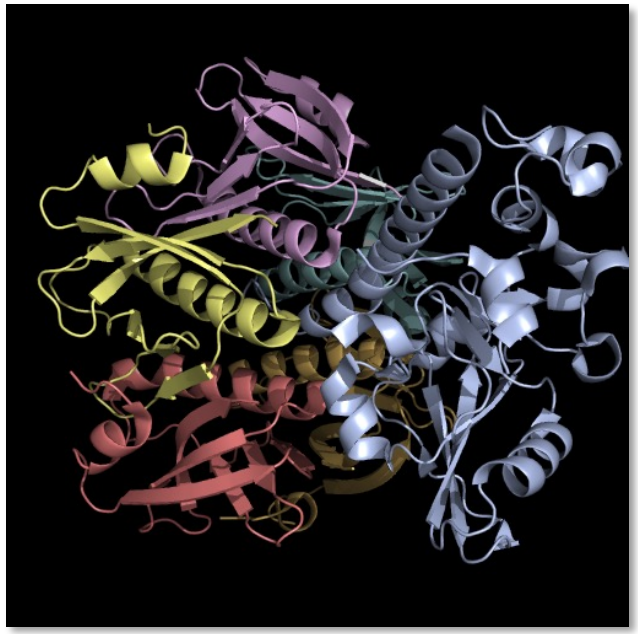
(Aus: Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 10. Gaffky.)

Die Cholera an der Grenze von Hamburg und Altona 1892
Hamburg filtrierte Trinkwasser – Altona nicht

Bau der Trinkwasserfiltrationsanlage, Hamburg 1892

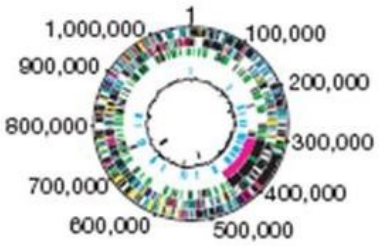


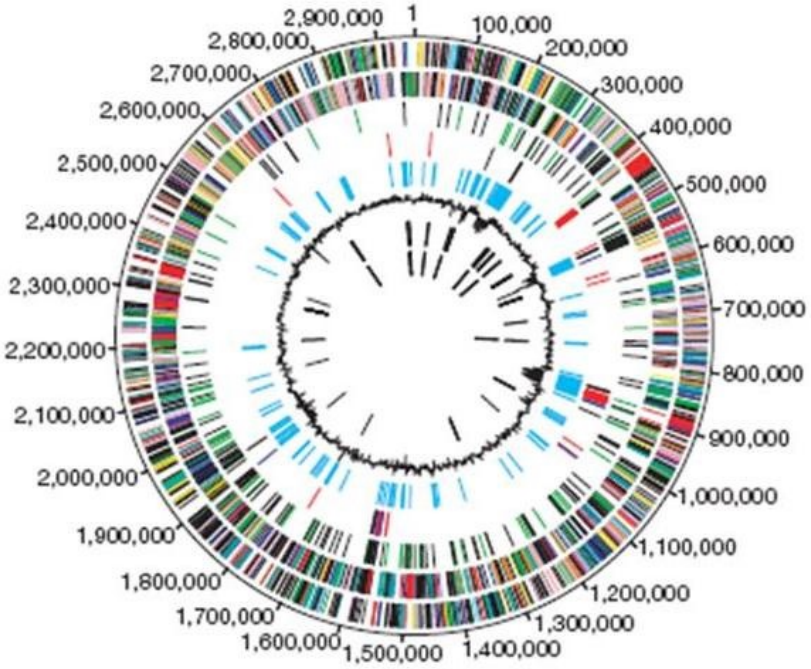
Das **Cholera-Toxin** ist ein hexameres (5 x B, 1x A) Protein,
das als GTPase-Hemmer auf eukaryotische
G-Proteine wirkt und dazu beiträgt,
dass das betroffene G-Protein immer aktiv ist;
es selbst hat ADP-ribosylierende Wirkung.

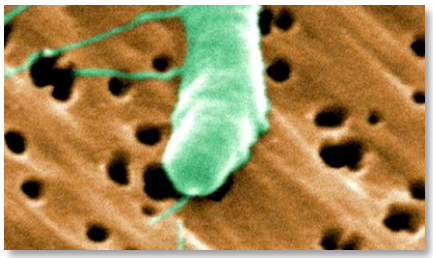


EC. 2.4.2.36 **Glycosyltransferase**;

sorgt für erhöhten cAMP-Level,
was wiederum zu erhöhter Aktivität von
Ionenkanälen führt:
Das Resultat ist dramatischer
Flüssigkeitsverlust.





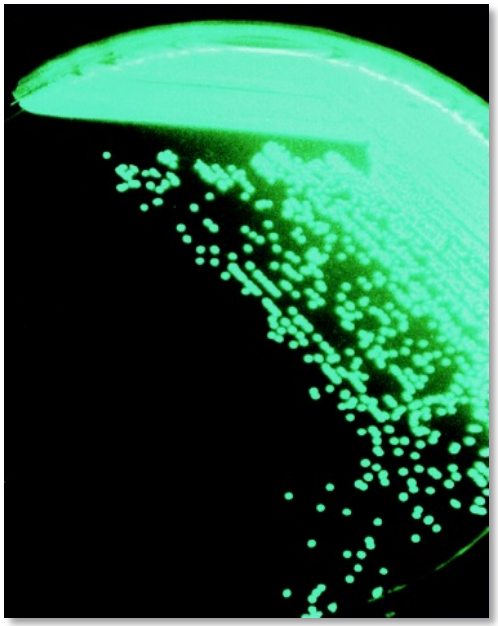


Das CT stammt aus dem Phagen CTXϕ; der sorgt erst dafür, dass der Stamm pathogen wird.

CTx ist auf dem Chromosom kodiert.

V. cholerae El Tor N16961, Heidelberger etal., Nature 2000

Leuchtbakterien



Symbionten von
Tiefseefischen und
Tintenfischen

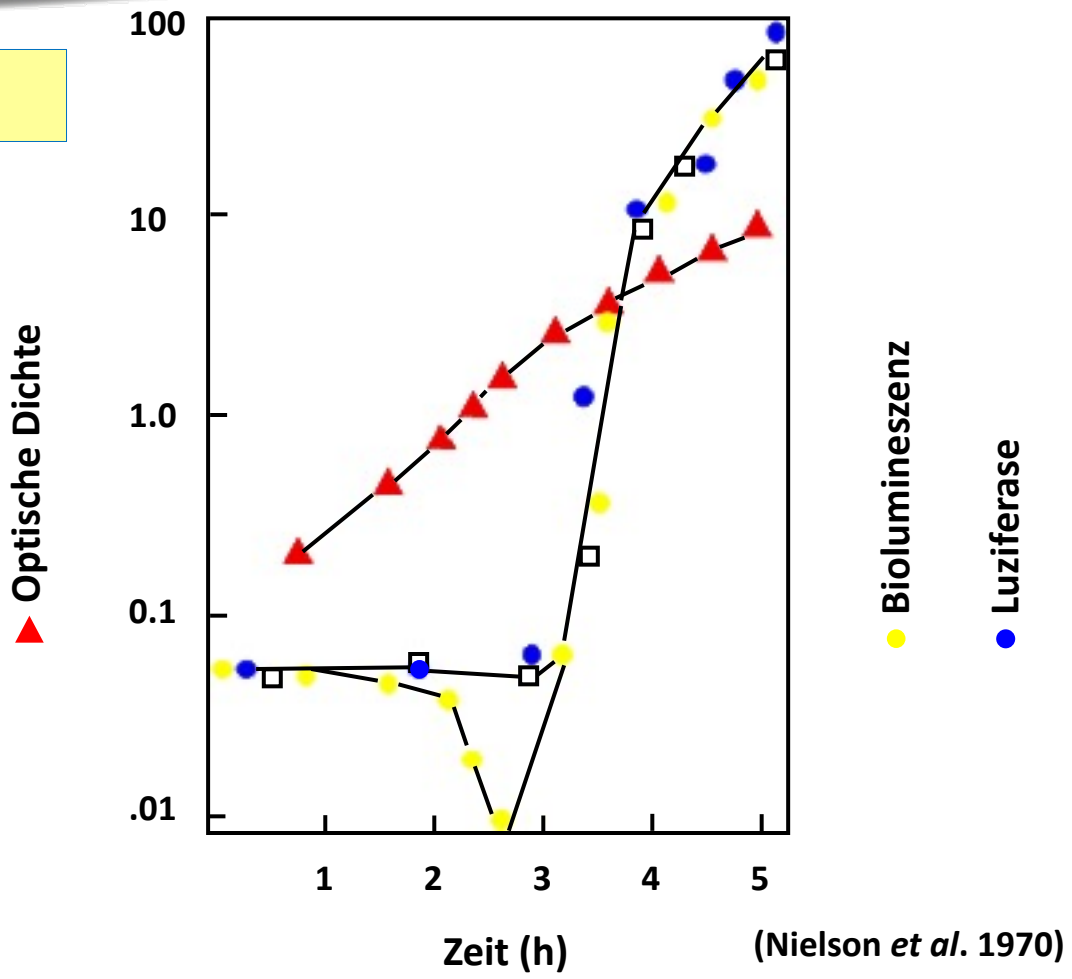
Leuchtbakterien kommunizieren über ihre Zelldichte: Quorum Sensing
sie produzieren Autoinducer (HSL),
HSL wird ausgeschieden und schaltet Gene (z.B. für Luciferase) an,
wenn die kritische Menge überschritten wird.

Autoinduktion bei *Vibrio fischeri*

- Bakterielle **Biolumineszenz**

  ist abhängig von der

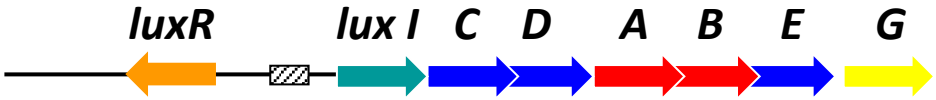
  Zelldichte



(Nielson *et al*. 1970)

Bildung der Luziferase ist abhängig von der Zelldichte

Regulation der lux-Gene in *Vibrio fischeri*



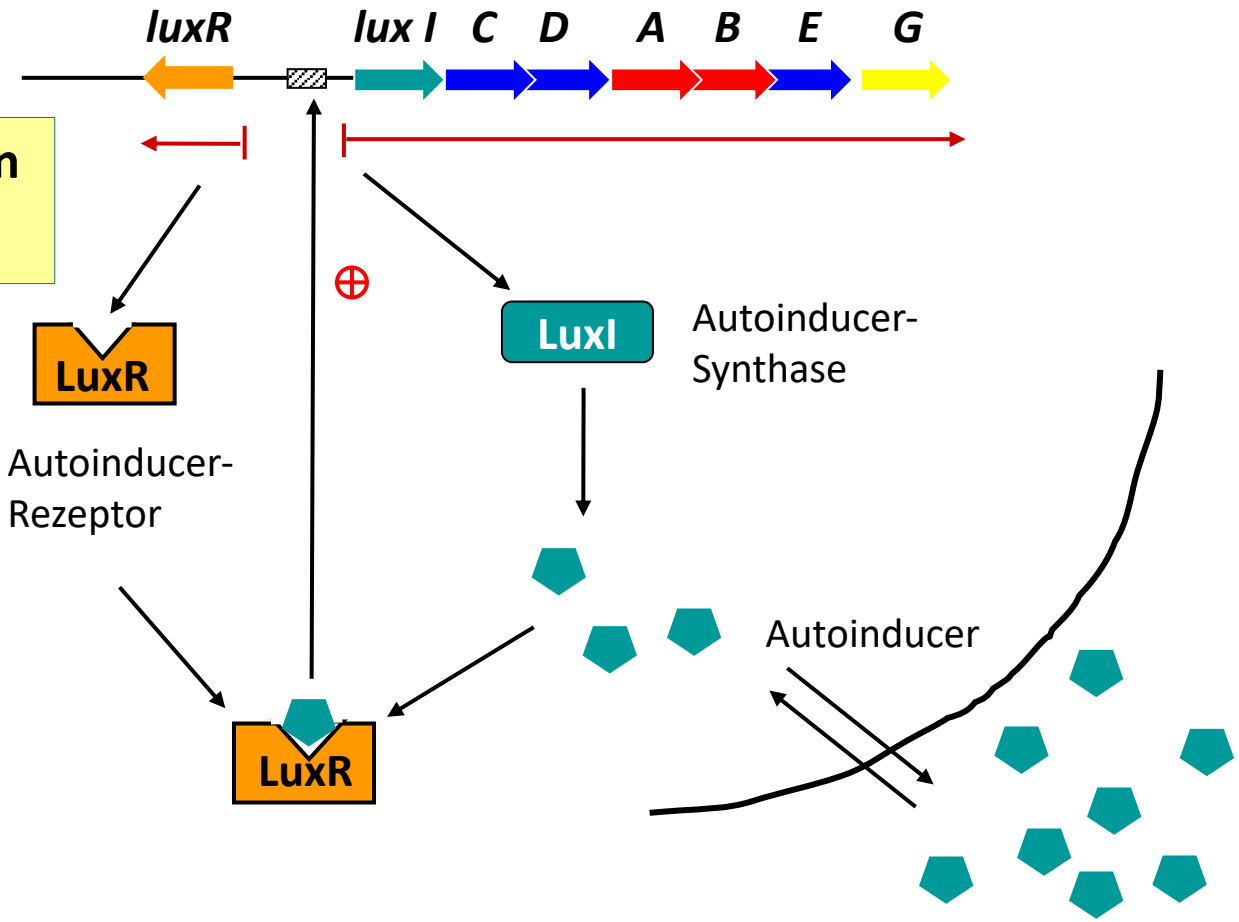
LuxR: ***Regulator***
LuxI: ***HSL-Synthase***

LuxCD: ***FS-Reduktase***
LuxE: ***FS-Transferase***

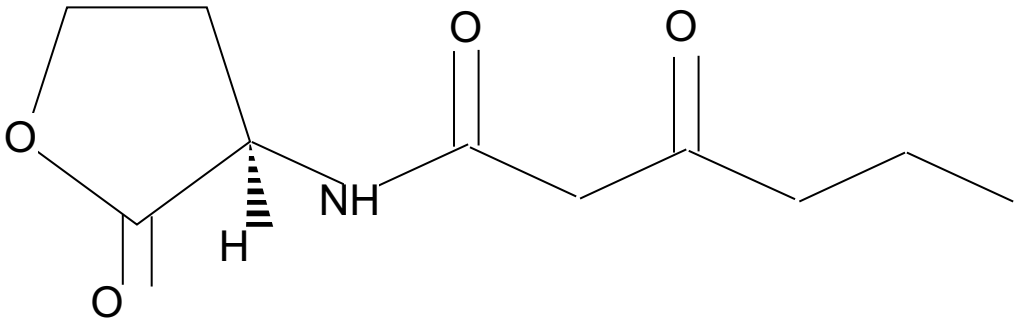
LuxAB: ***Luziferase (Monoxygenase)***

LuxG: ***NAD(P)H:flavin oxidoreductase***

Regulation der lux-Gene in *Vibrio fischeri*



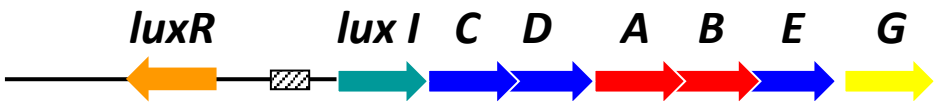
LuxR ist ein Dimer; der C-terminale Teil des Proteins enthält ein HTH-Motif für die Interaktion mit DNA bzw. der lux box



3-oxo-C6-HSL

Autoinducer I ist chemisch gesehen ein N-Acyl-Homoserin-Lakton.
Einzig die Kettenlänge variiert von C4-C18.
Das Molekül ist sehr hydrophob und je länger die Kettenlänge, desto hydrophober; es kann also prima die Membran per Diffusion passieren.

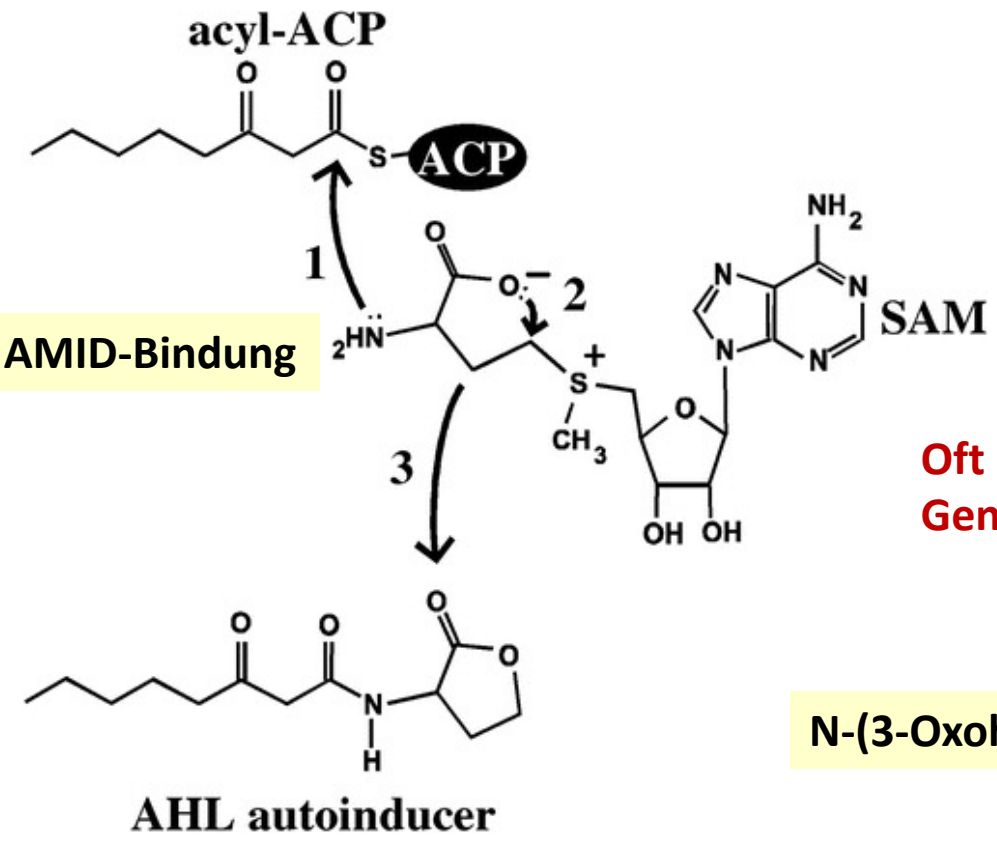
Regulation der lux-Gene in *Vibrio fischeri*

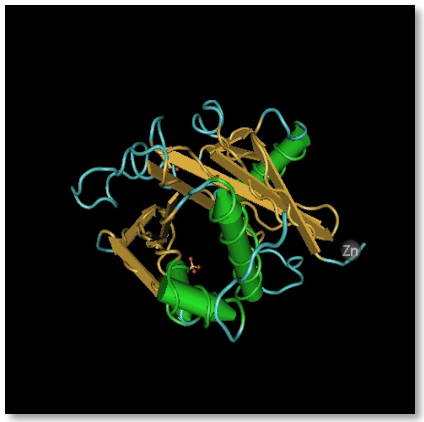


- Schwache konstitutive Synthese des Autoinducers bis die erforderliche Konzentration für die Induktion erreicht ist
- Bindung des Autoinducers an LuxR
- LuxR-Autoinducer-Komplex aktiviert *lux*-Gen-Transkription
- Vermehrte Bildung des Autoinducers: Positive Rückkopplung
- Synthese des Luziferase und der Aldehydsynthase

➢ **<u>Synthese</u>: *luxI*-Genprodukt (Acyl-Homoserinlaktonsynthase auch AHL-Synthase)**

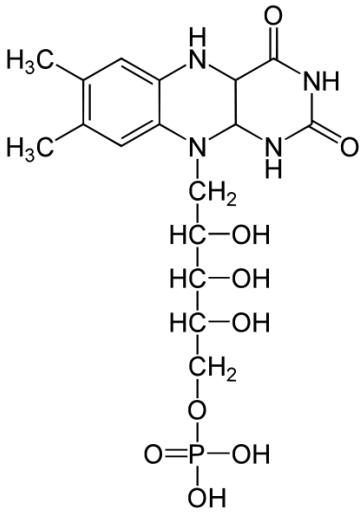
Autoinducer von *Vibrio fischeri*





Oft mehrere *luxI*-Gene in einer Zelle

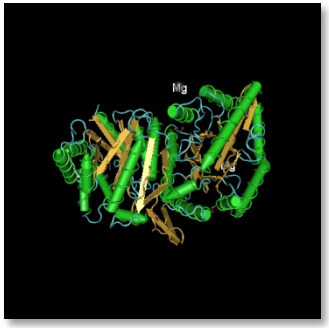
N-(3-Oxohexanoyl)-L-homoserinlakton

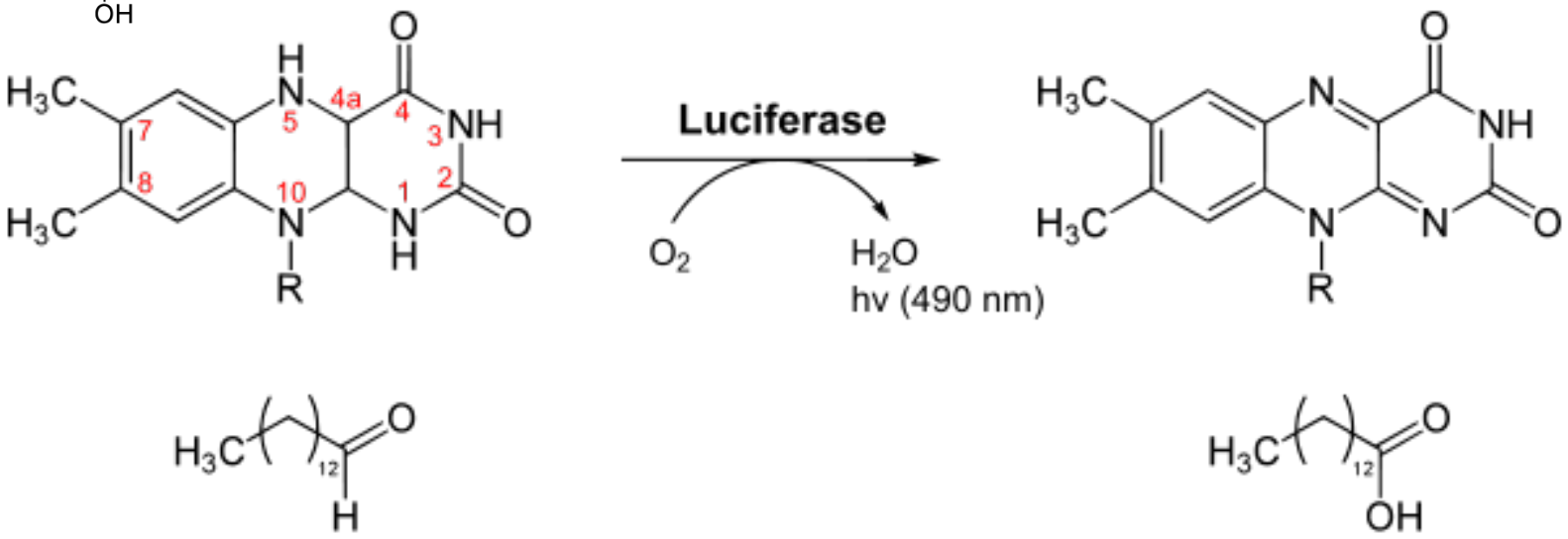


Lichtproduktion bei *Vibrio fischeri* durch Oxidation

oxidiert wird ein Tetradekanal (Aldehyd zu Carbonsäure)

Emission dann bei 490 nm (blau-grünes Licht)





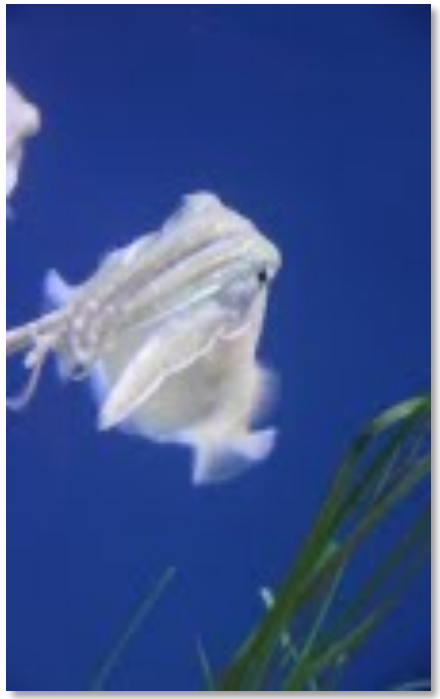
Vibrio fischeri

John Hastings und
Kenneth Nealson
Harvard University, 1970
„Autoinducer“

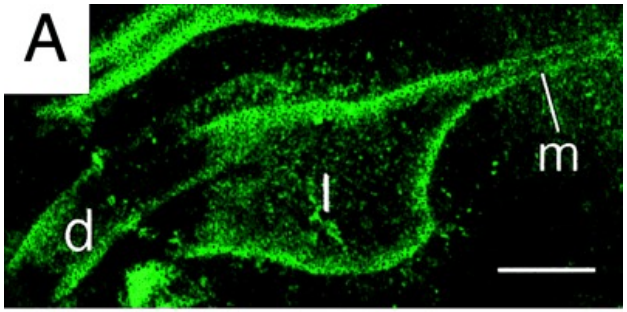
- **Gram-negatives, marines Bakterium**
- **Freilebend: Keine Lichtemission**
- **In Symbiose mit *Euprymna scolopes***

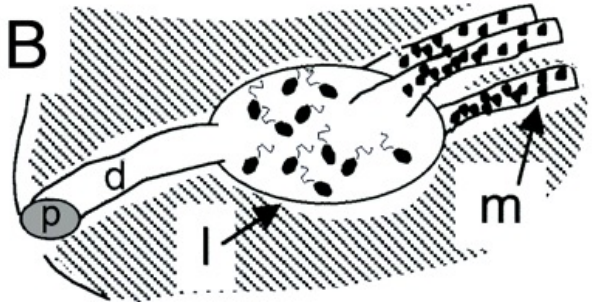
→ **Biolumineszenz**

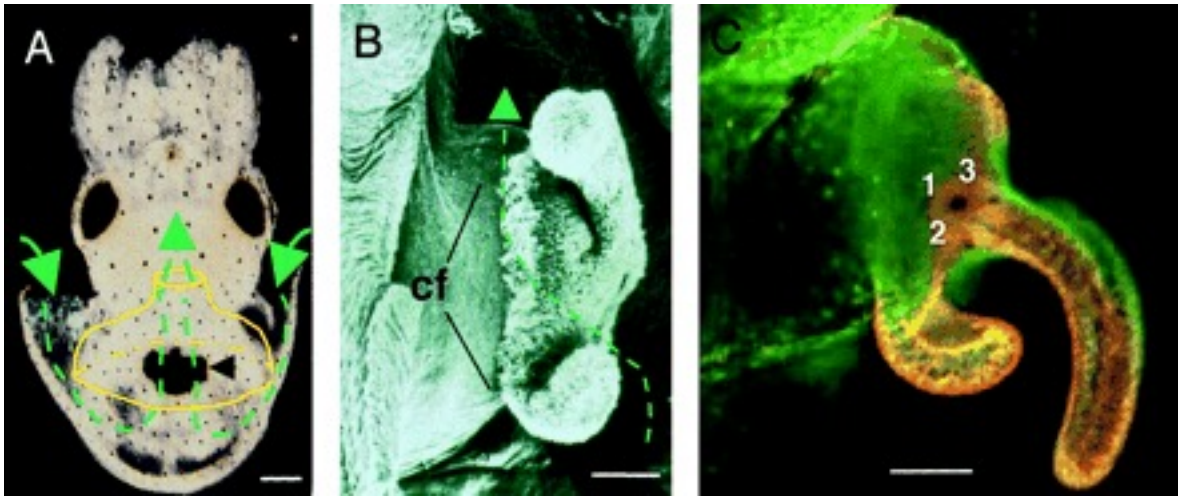
Euprymna scolopes



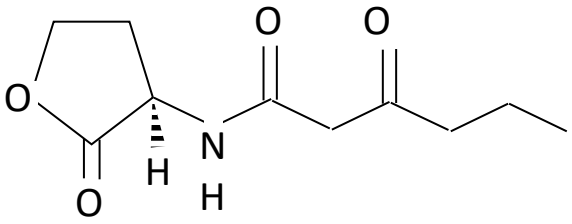
Euprymna scolopes: Leuchtorgan





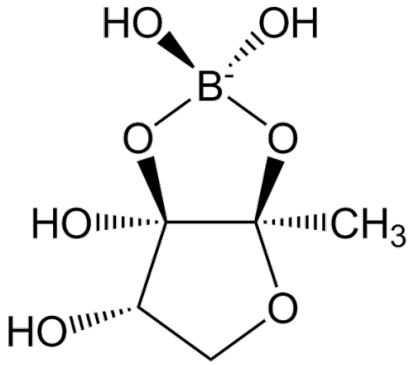


J. Bacteriol. **April 2000** vol. 182 no. 7 **1779-1787**



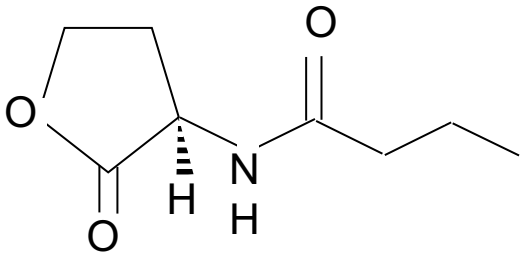
3-oxo-C6-HSL

Autoinducer I

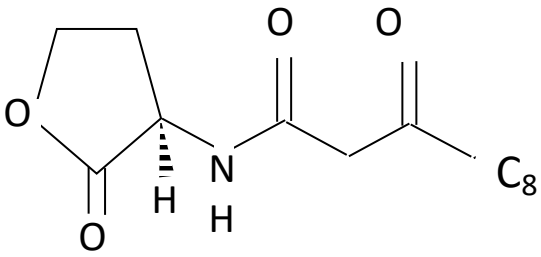


Autoinducer II

Vibrio harveyi

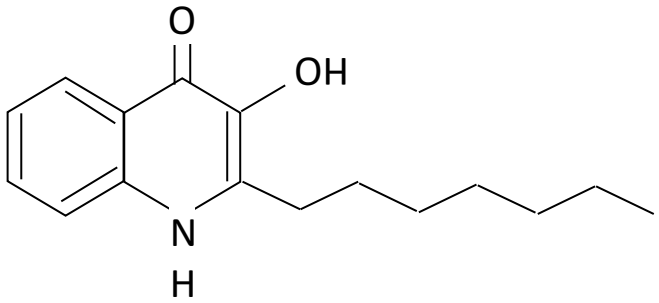


N-butyryl-L-HSL

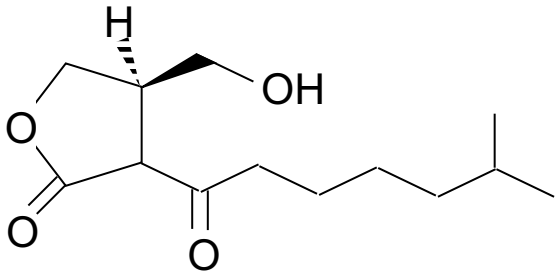


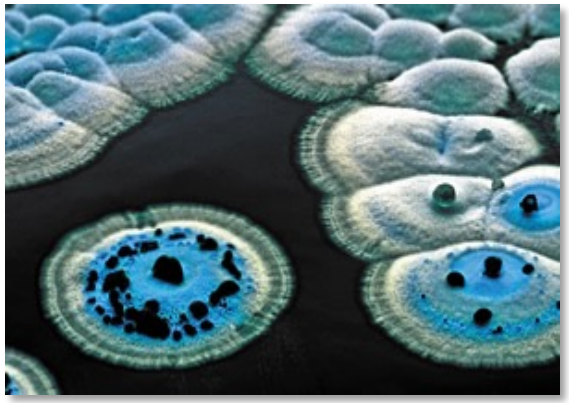
N-3-oxo-dodecanoyl-L-HSL

Pseudomonas aeruginosa



2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone



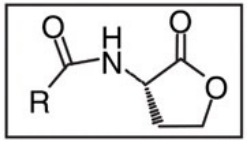


S. coelicor

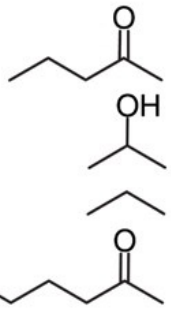
γ-butryolactone von ***Streptomyces griseus***

Acyl homoserine lactone autoinducers

Core molecule



R groups



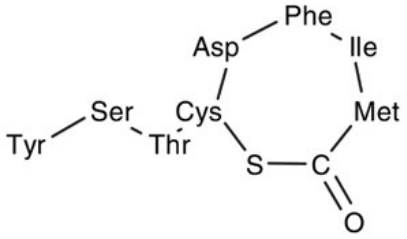
Vibrio fischeri

Vibrio harveyi

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa

Oligopeptide autoinducers

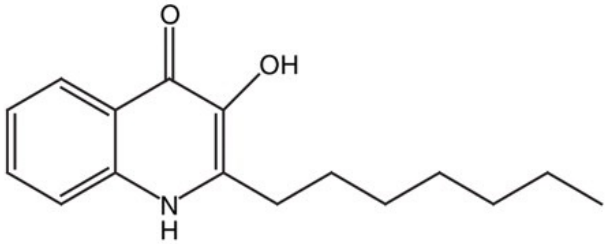


Staphylococcus aureus

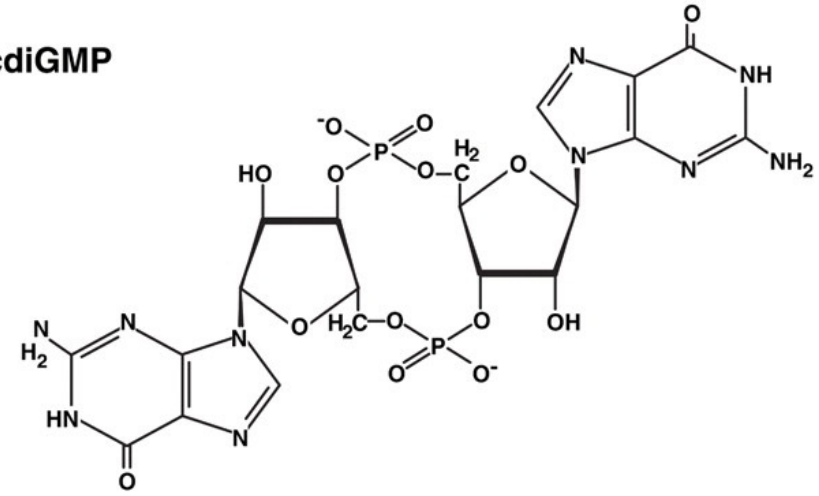
ADPITRQ*WGD — *Bacillus subtilis*

EMRLSKFFRDFILQRKKO — *Streptococcus pneumoniae*

***P. aeruginosa* PQS**



cdiGMP



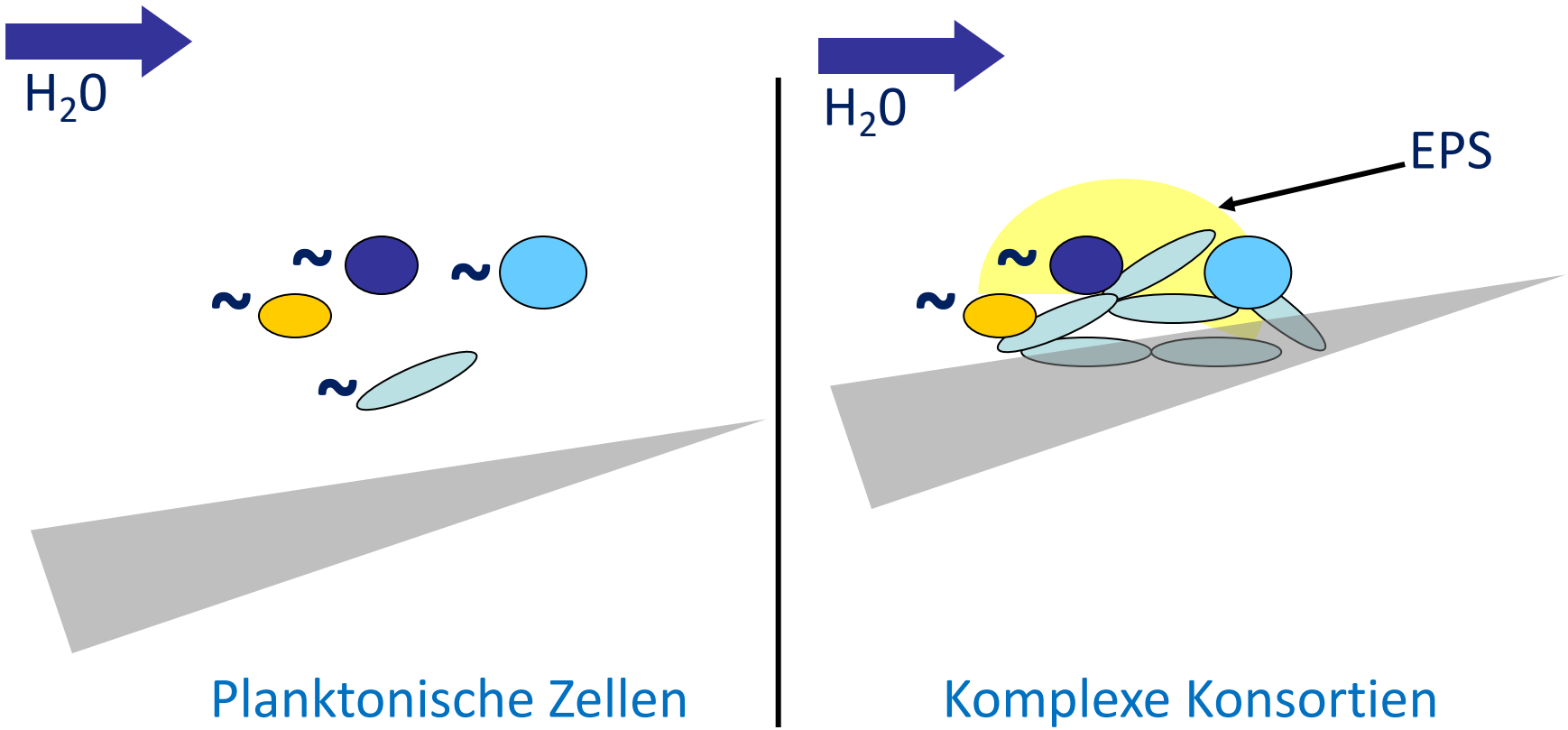
Thema der Vorlesung

Mikrobielle Biofilme

Definitionen

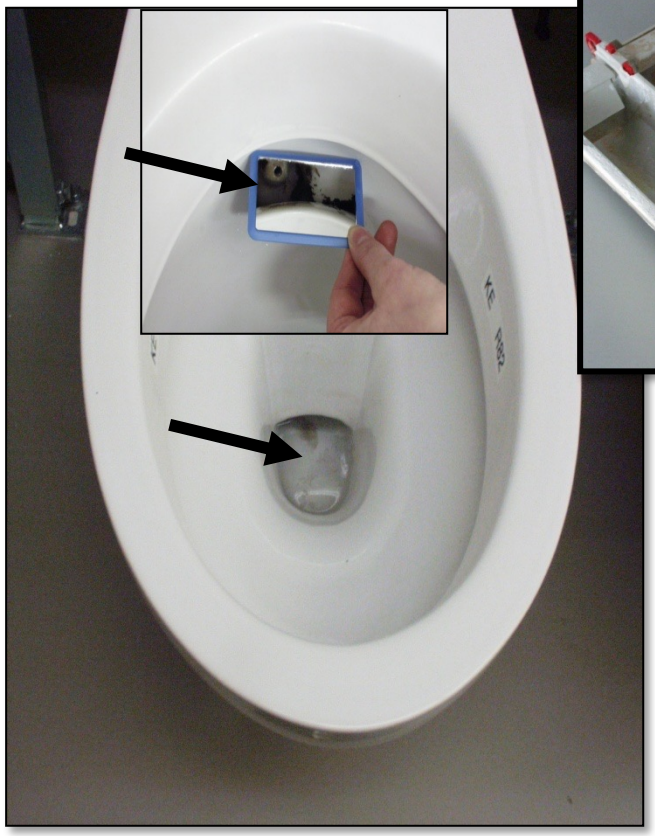
Relevanz

Molekularbiologie von Biofilmen


H_2O
H_2O
EPS
Planktonische Zellen
Komplexe Konsortien

Biofilm
Bezeichnungen

- **planktonisch** Zellen in der Flüssigphase, frei beweglich
- **sessil** Zellen fest an die Oberfläche angeheftet, nicht mobil
- **Biofilm** Gemeinschaft von Mikroorganismen, an eine Oberfläche gebunden
- **Pellicle** Biofilm in einer Kultur an einer Grenzfläche (Wasser/Luft/Öl/ etc.)



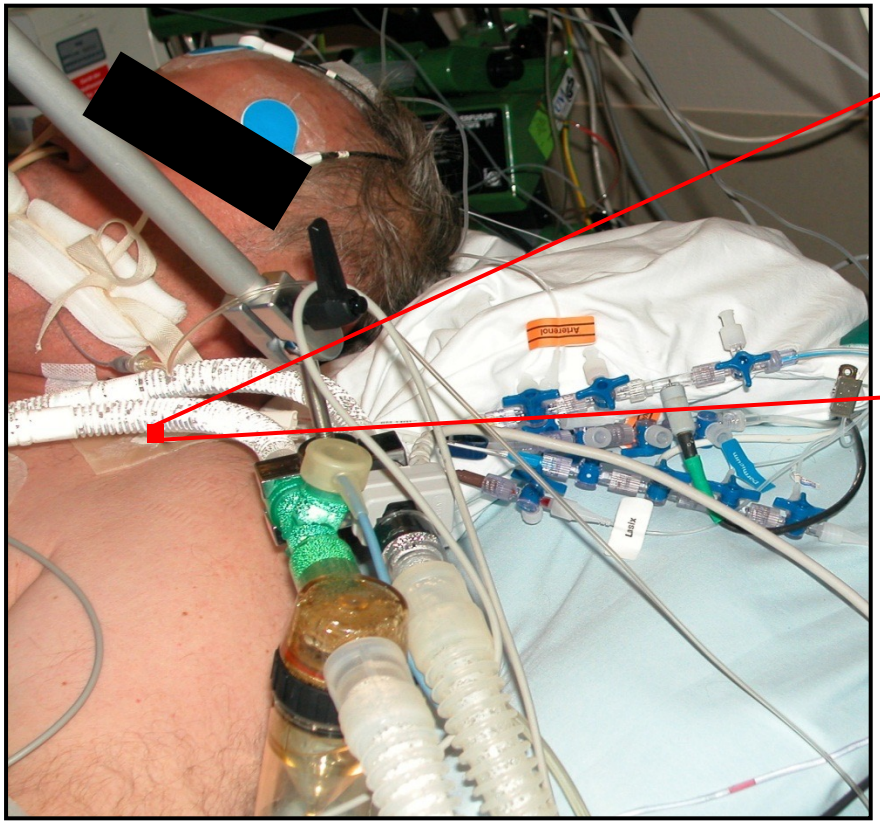
Biofilme auch zu Hause in Küche, Bad etc.

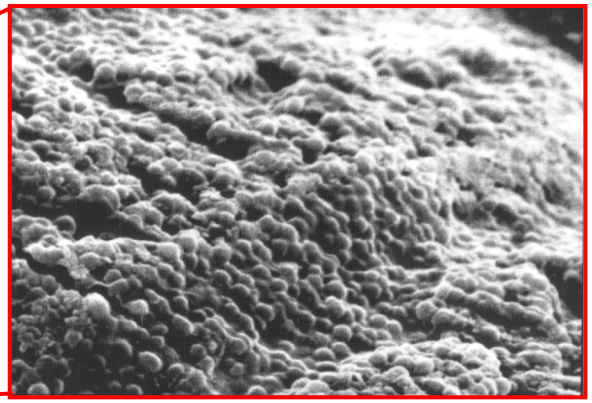
Duschwanne
20 000*
Wischmopp
1 000 000 000
Toilettenrand
33 000
Türklinke
71 000
Spülschwamm
100 000 000
Mülleimer
124 000
Kühlschrank
113 000
1 Verschiedene Lappen für Bad und Küche verwenden. Bakterien setzen sich fest, übertragen sich beim Wischen. Lappen alle 14 Tage erneuern.
2 Bad und Küche trockenhalten und gut lüften: Bakterien vermehren sich schneller im Feuchten.
3 In den Poren von Holzprodukten setzen sich leichter Bakterien fest als in Plastik. Umsteigen!
4 Wenn Lebensmittel in einer Kunststoff-Box verderben, heißt es: weg mit dem Behälter!
5 Abfalleimer alle 2 Wochen mit Putzmittel auswaschen und vollständig trocknen lassen, bevor Sie einen neuen Müllsack hineinlegen.
FOTO: HUGH KRETSCHMER/RODALE PRESS; GRAFIK: ANTJE GRAF

Men´s Health 2006

Die Küche als prima Feucht-Biotop !

HC-Flemming, DUE

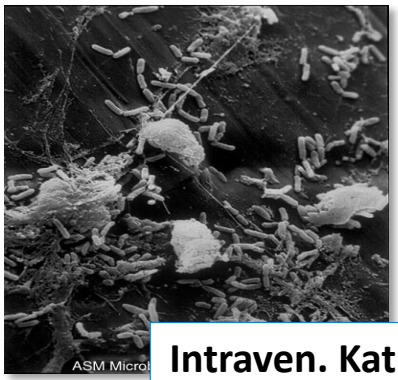




Persistend infections
Poor diagnostic tools
Failure of antibiotic therapy

H. Rohde, UKE Hamburg

Implantate/Katheter

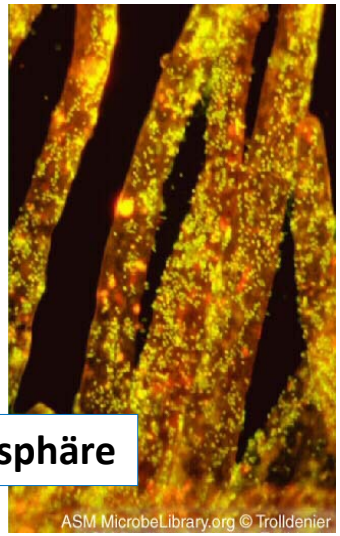


Intraven. Katheter

Silikon-Implantate

Pflanzenoberflächen

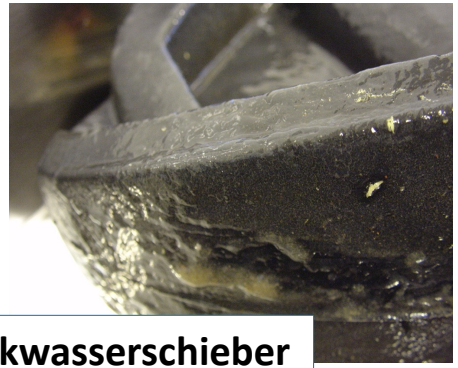
Blattoberfläche



Rhizosphäre

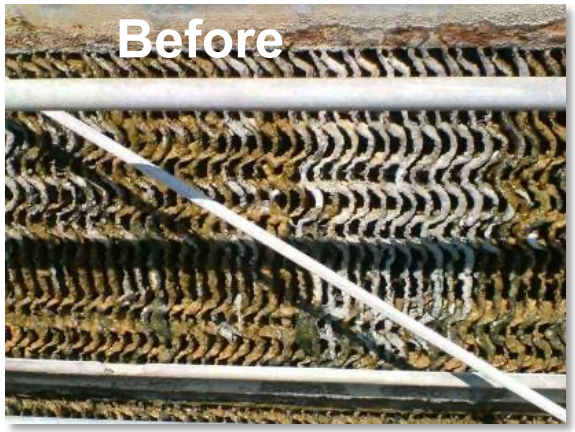
Industrieanlagen (Biofouling)

Papierfabrik



Trinkwasserschieber

http://www.microbelibrary.org/



Sabria et al., 2006

Consequence:

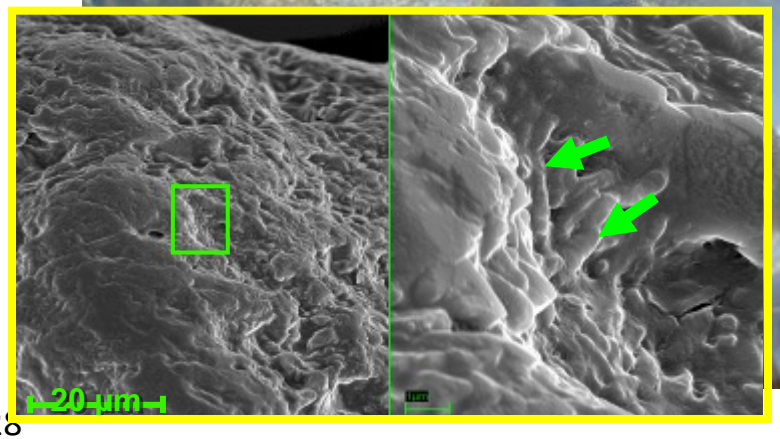
⇨ enhanced dispersion of aerosols

⇨ increase of incedence of legionellosis

Biofilme an schönen Orten

Epilithische Biofilme

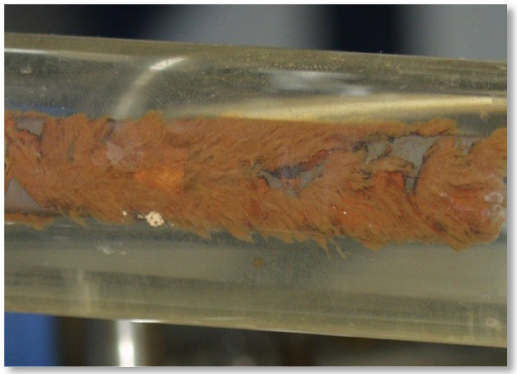
Etwa hier rutschen Sie aus



Biofilm-Warnzeichen

Gutes Beispiel für Legionellen-Biofilm im Sommer 2013
165 Infizierte, 3 Todesfälle

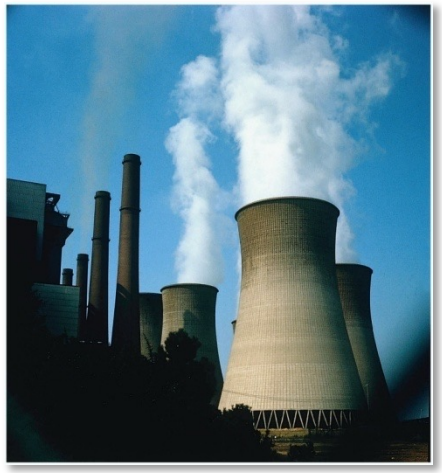
Der Keimherd blieb ungeklärt, aber auf jeden Fall bestand eine hohe Belastung in der Kläranlage einer lokalen Brauerei

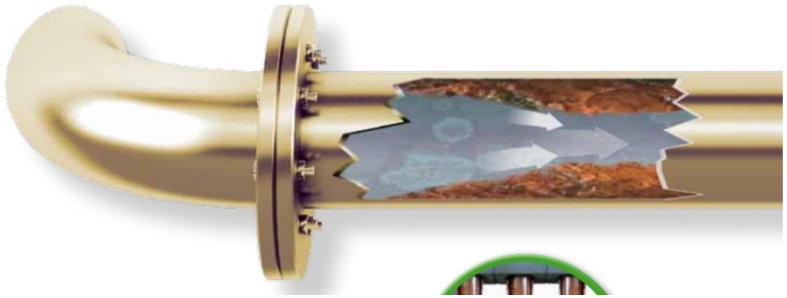


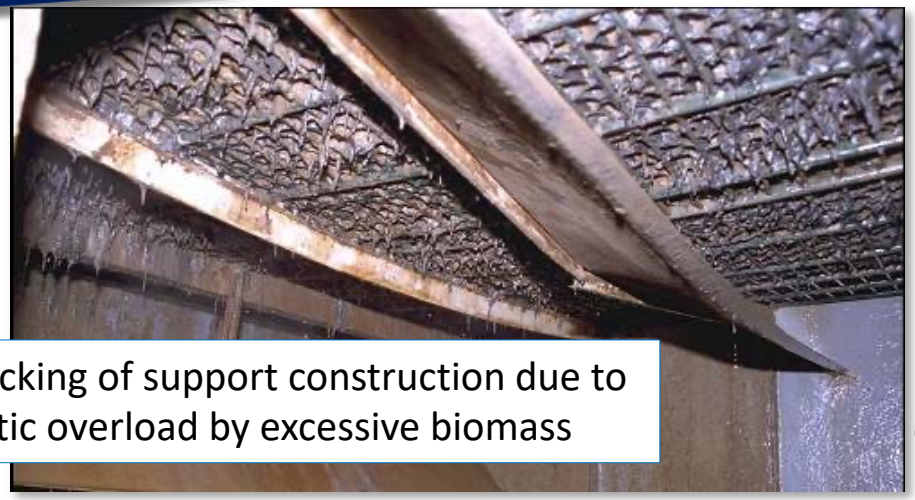
Wasserbehandlung

Industrielle Reiniger

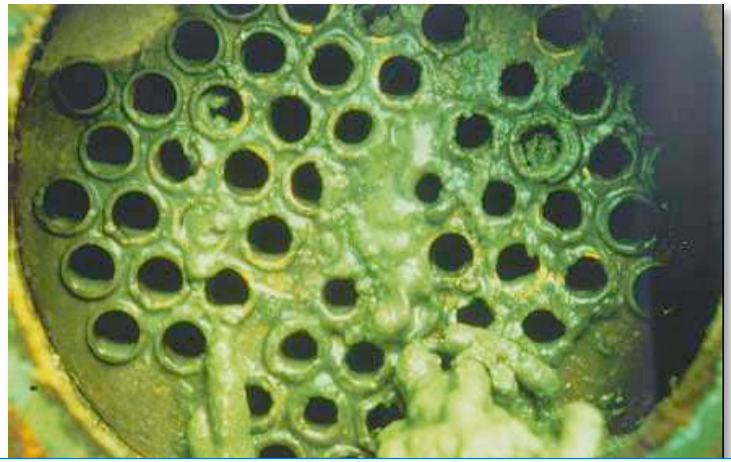
Metallbehandlung







Cracking of support construction due to
Static overload by excessive biomass



Heat exchangers with massive biofouling

Biofilm Centre, Duisburg, GE

Biofilme im und am Menschen

***E. coli* EHEC** Diarrhoe und "Haemolytic Uraemic syndrome" (HUS)

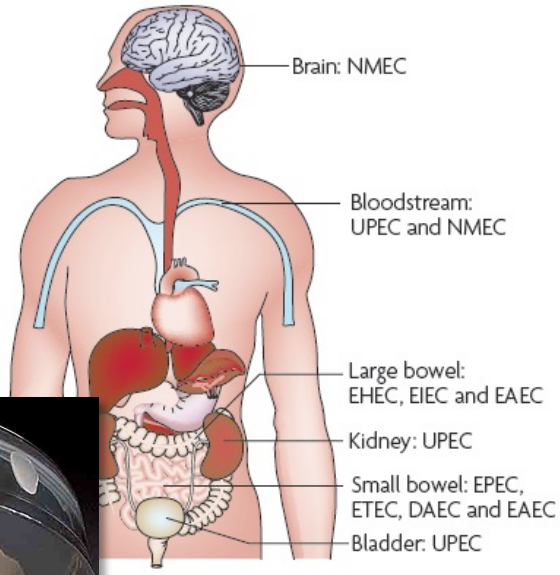
Vibrio cholerae Cholera-Toxin und Infektion QS-reguliert

Pseudomonas aeruginosa

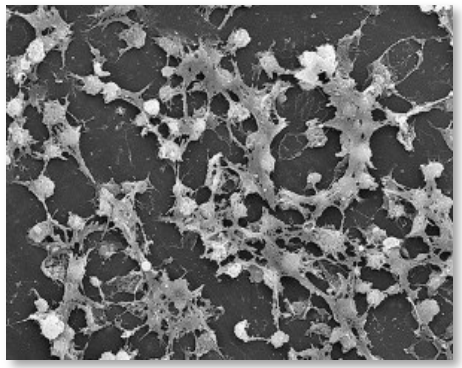
CF-Lungen, Implantate
zusammen mit anderen, z.B.:
Burkholderia, Stenotrophomonas, Acinetobacter etc.

Streptococcus mutans Karies

Staphylococcus aureus Herzkatheter

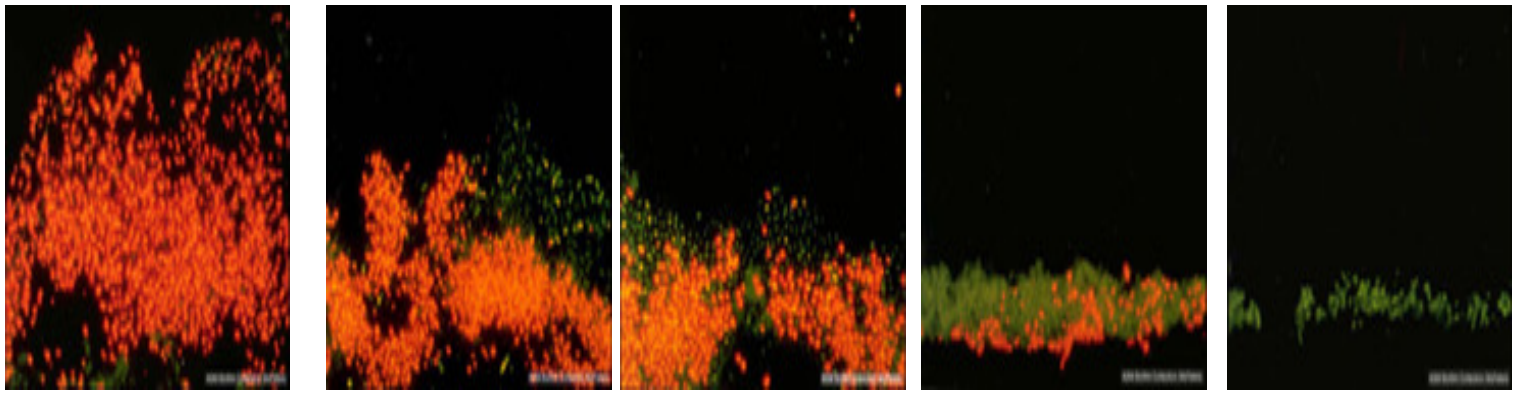


Croxen, et al. nature,2010



Centers for Disease Control and Prevention

Hohe Resistenz von Biofilmen gegenüber Desinfektionsmitteln

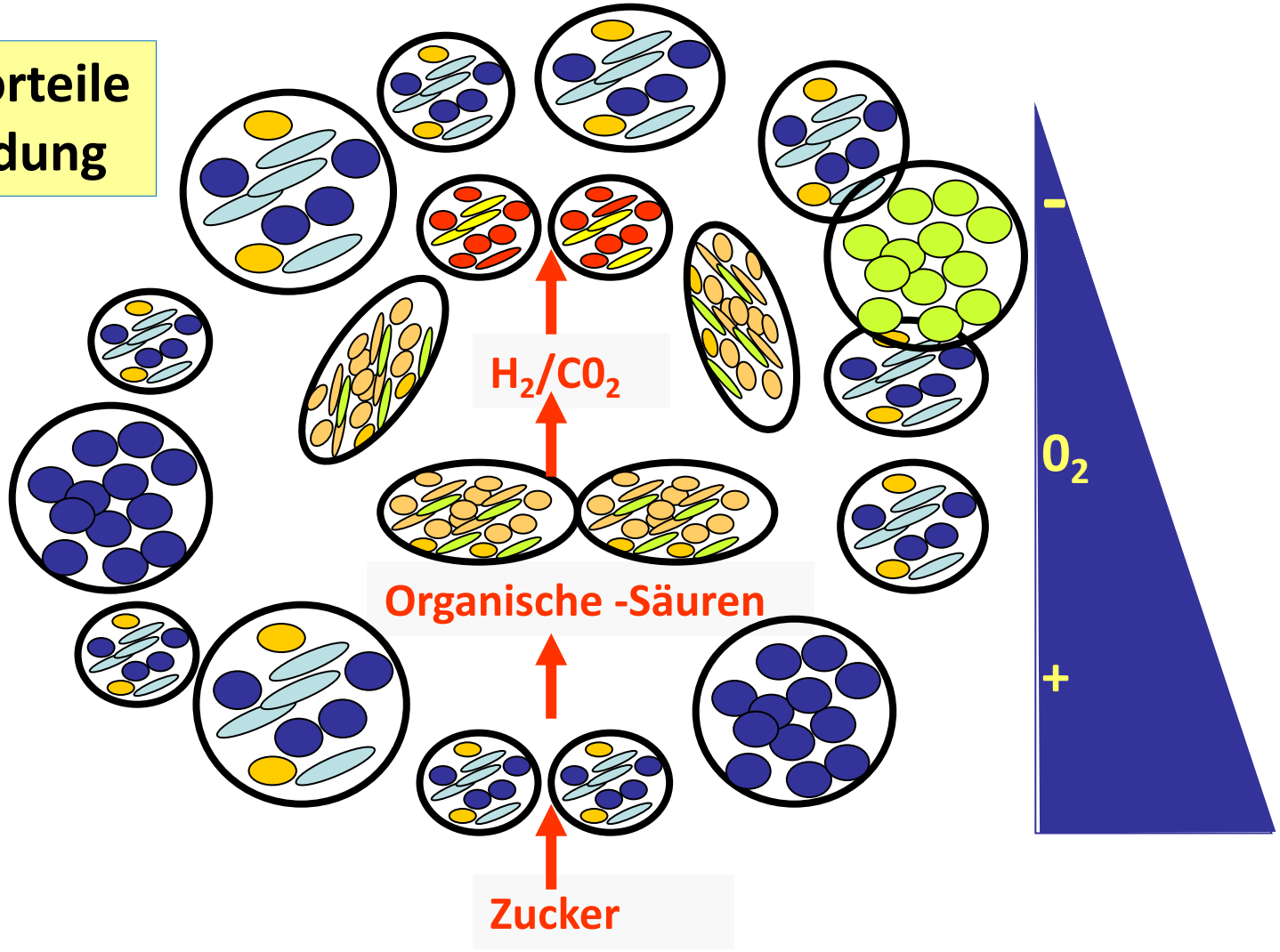


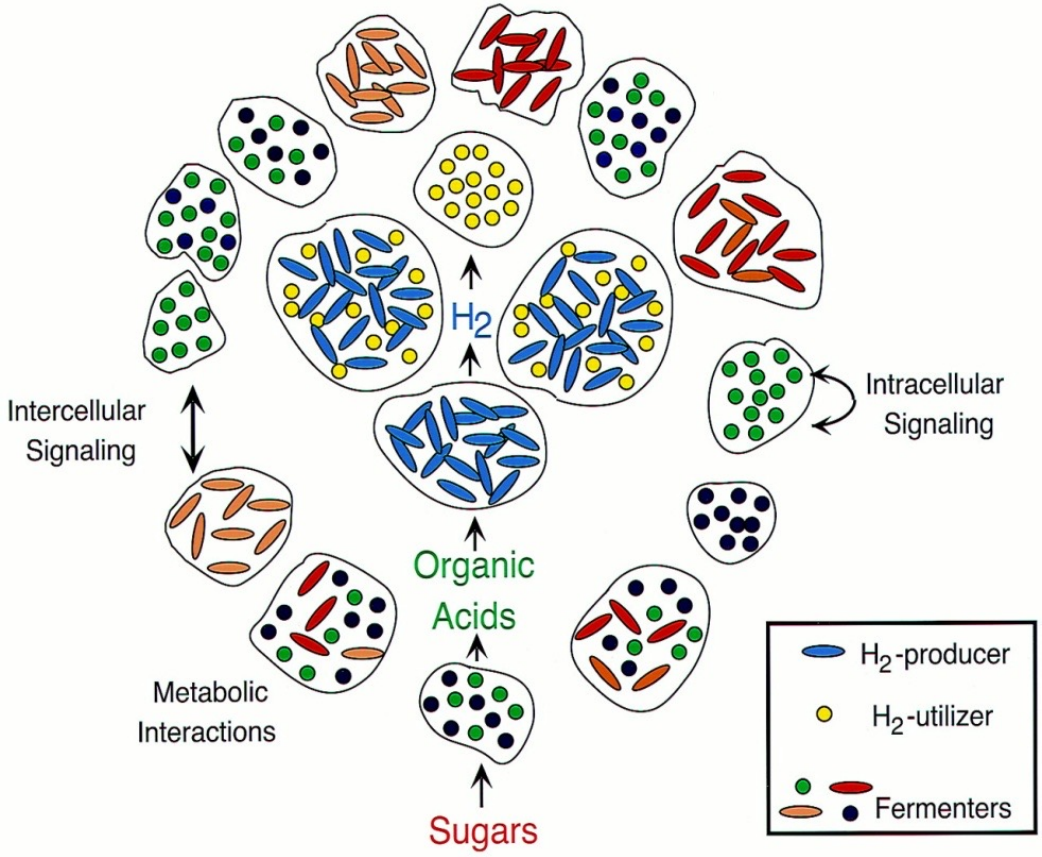
C 30 60 90 120

Inkubationszeit (min)

http://www.microbelibrary.org/

Ökologische Vorteile der Biofilmbildung





Ökologische Vorteile der Biofilmbildung

Klassisches Beispiel:

→

H_2-Erzeuger: ***Syntrophomonas* sp.**

H_2-*Utilizer*: ***Methanosarcina* sp.**

$C0_2 + 4\ H_2$ $CH_4 + 2H_20$

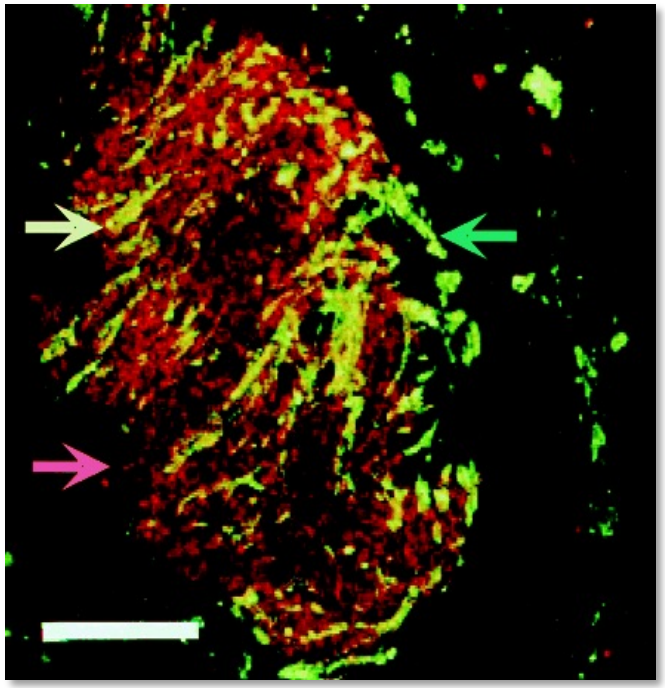
△ G°‘ = -131 KJ / Mol CH_4

Davey & O‘Toole, 2000, MMBR; http://mmbr.asm.org/cgi/content/full/64/4/847#F1

Syntrophes Wachstum in einem Schlamm-Biofilm

Mischung aus roter und grüner Fluoreszenz / Kolonien (Gelb)

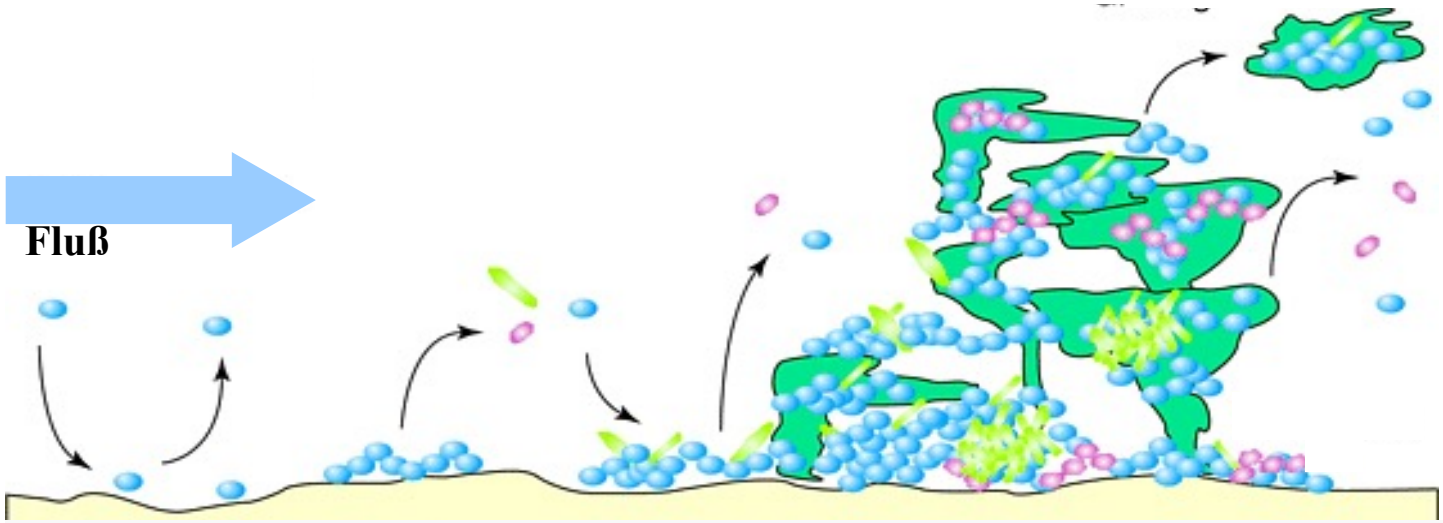
***Synthrophus* sp. (Propionat-Verwerter) (Rot)**



Methanogene Mikroorganismen (Grün)

Davey & O'Toole & W. de Vos, 2000, MMBR; http://mmbr.asm.org/cgi/content/full/64/4/847#F1

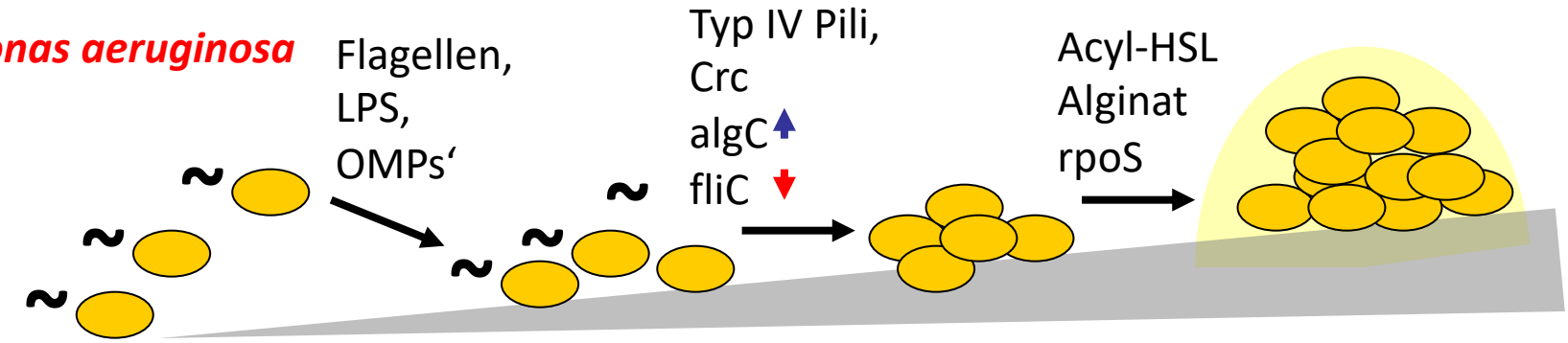
Plankt. Zellen	Monolayer	Mikrokolonien	Makrokolonien	vollständiger Biofilm	sensezenter Biofilm



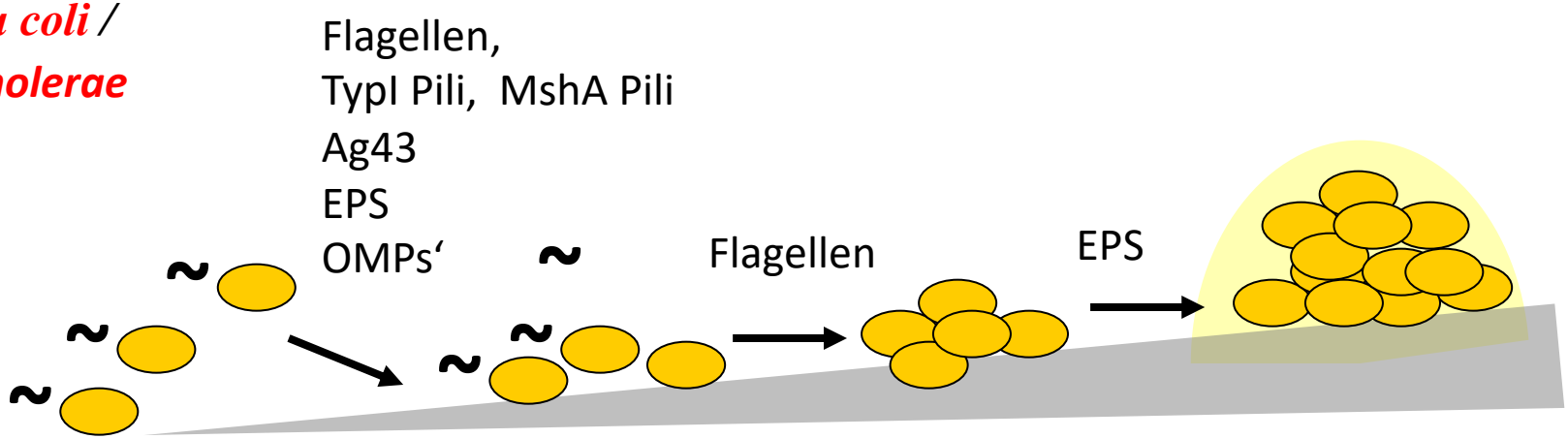
Anheftung (reversibel/ irreversibel)	Initiales Wachstum	Akkumulation	„Höhen-Wachstum“	Auflösung/ Seneszenz

planktonische Zellen **Monolayer** **Mikrokolonien** **Makrokolonien** **vollständiger Biofilm**

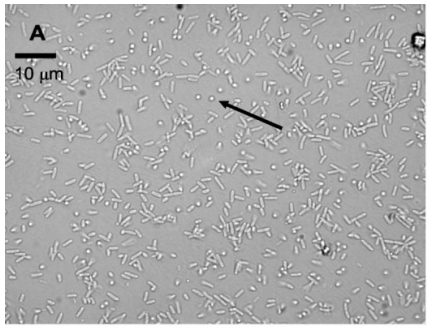
Pseudomonas aeruginosa

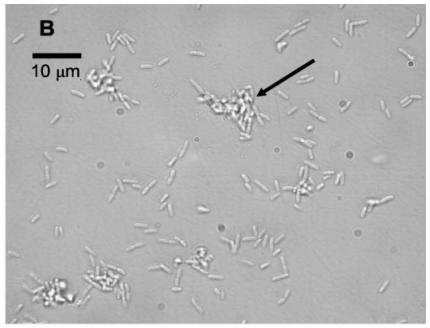


***Escherichia coli* /**
Vibrio cholerae



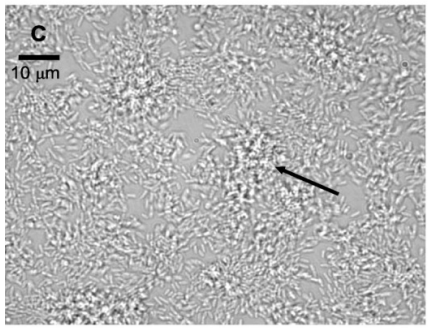
A. Reversible attachment

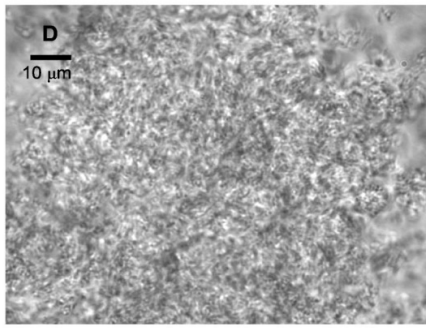




B. Irreversible Attachment cell clusters

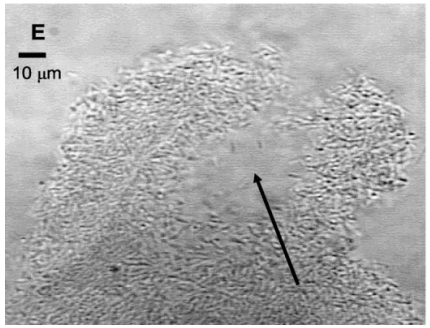
C. Maturation several cells thick

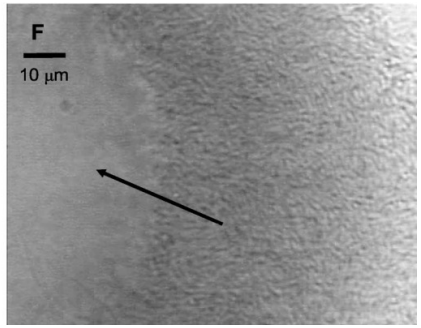




D. Maturation 2 cells reach max thickness

E. Dispersion

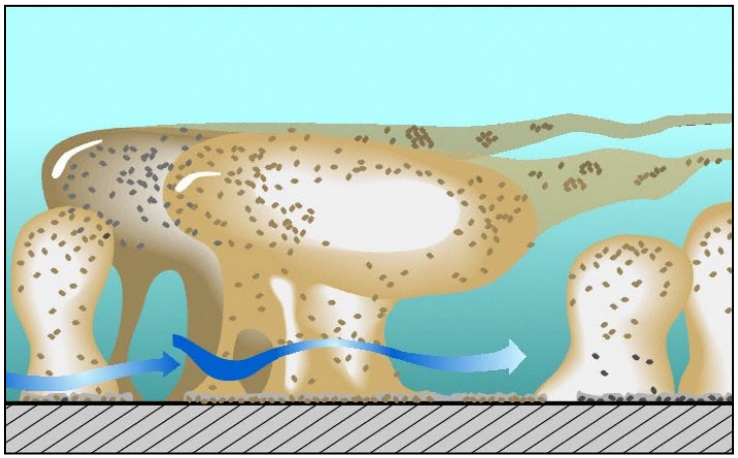




F. Dispersion

Unterschiedliche Spezies bilden leicht unterschiedliche Formen von Biofilmen

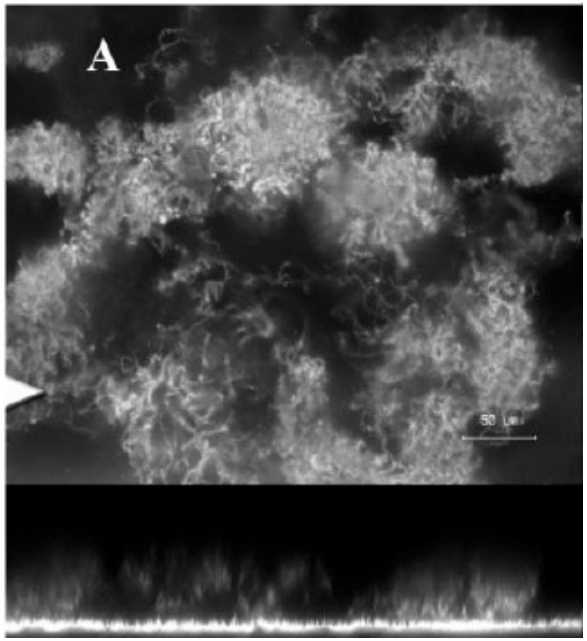
Das “mushroom model” ist korrekt für *P. aeruginosa*, aber nicht für Serratia



The „mushroom model“

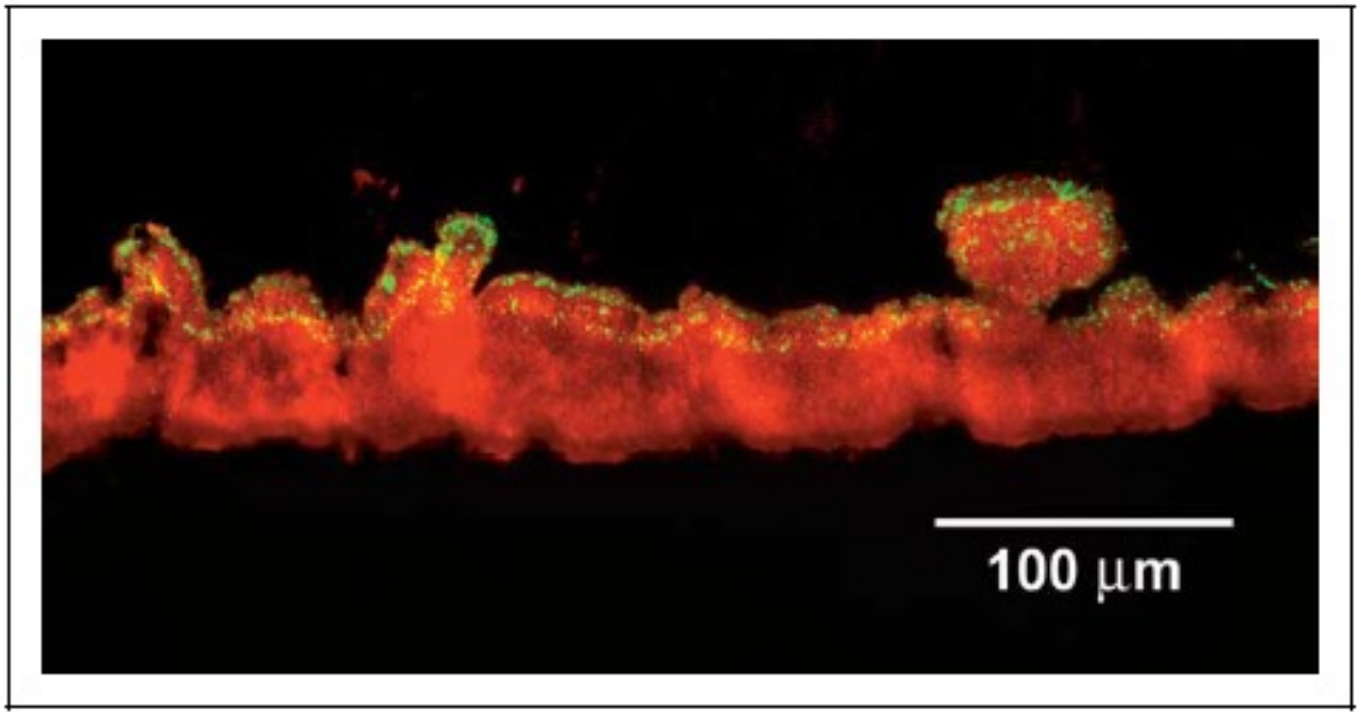
Sessile Zellen sind eingebettet in eine Matrix, die aussieht wie Pilze oder Türme und von Tunnelsystemen/Poren umgeben ist. In diesen Poren/Kanälen fließt freies Wasser/Nährstoffe.

Serratia bildet eher Türme
Mit horizontalen Brücken



Serratia marcescens

Der “Biofilm Phaenotyp“ - unterschiedliche Zellen leisten unterschiedliche Aufgaben

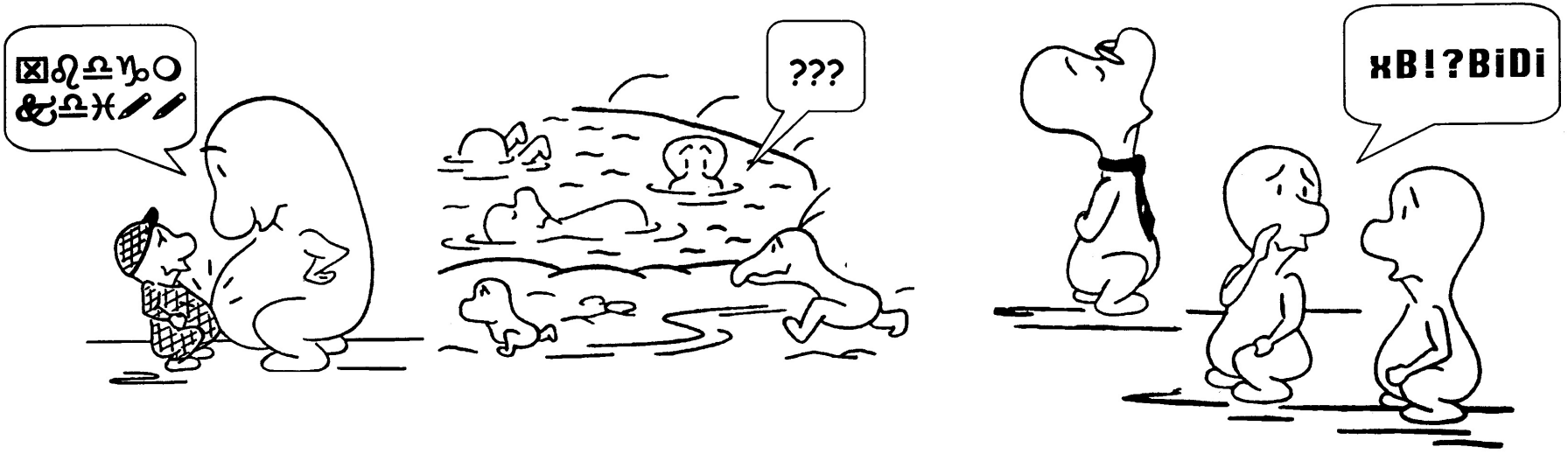


Fux *et al.*, 2005

Arbeitsteilung im Biofilm; grüne und rote Farben zeigen, dass die Zellen in Biofilmen unterschiedliche physiologische Aktivitätenbesitzen können.

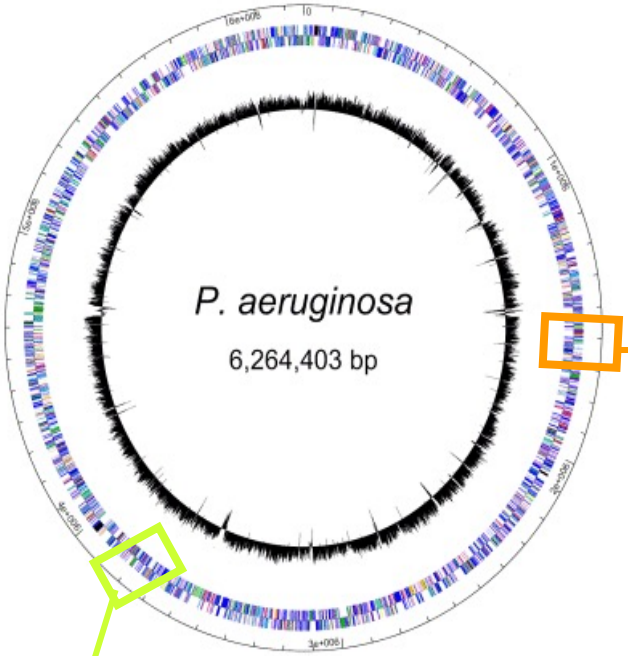
Grüne Zellen sind in der Lage ein Protein zu synthetisieren - in Abhängigkeit eines Umweltreizes; rote Zellen nicht.

Quorum sensing: Bakterielle Zell-Zell-Kommunikation ist essentiell für Biofilmbildung



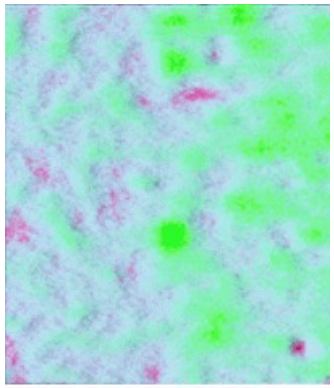
→ Siehe VL zu Enterobakteriacae

In *P. aeruginosa* sind die *las* und *rhl Quorum Sensing* Systeme essentiell für die Biofilmbildung

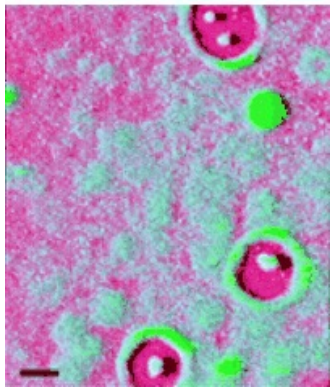


lasR/lasI

rhlR/rhlI



Wildtyp

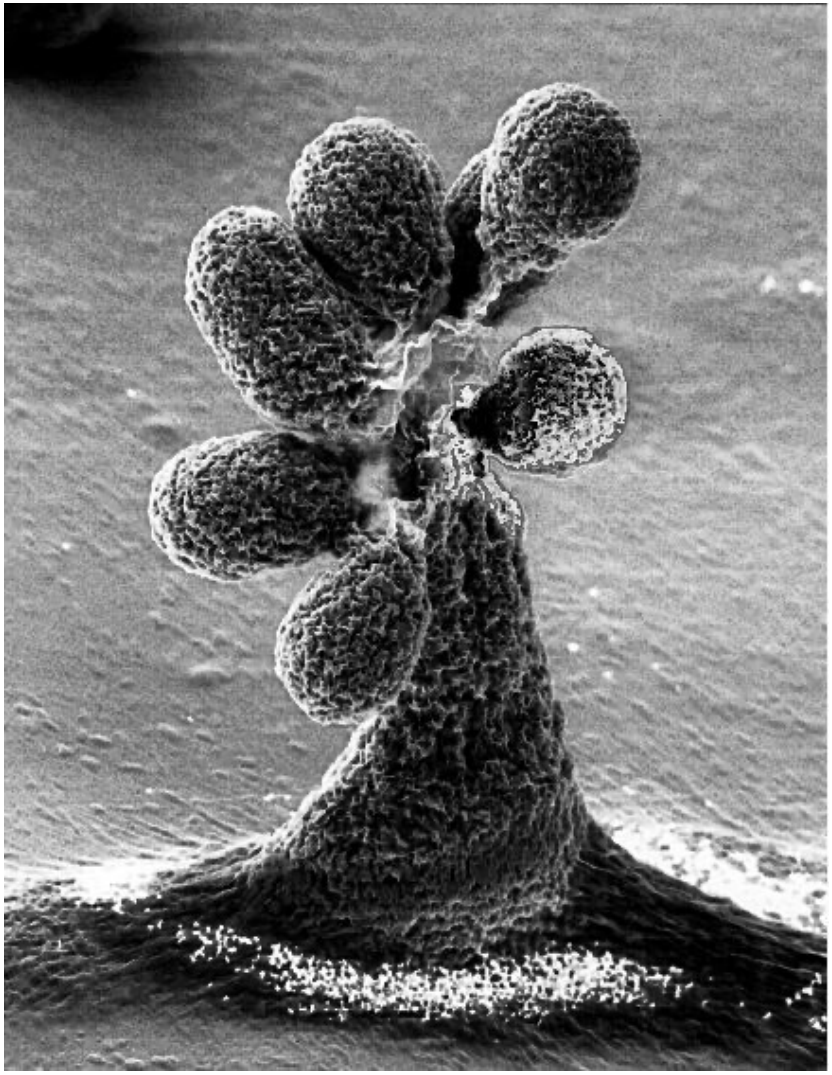


lasR/I-Mutante

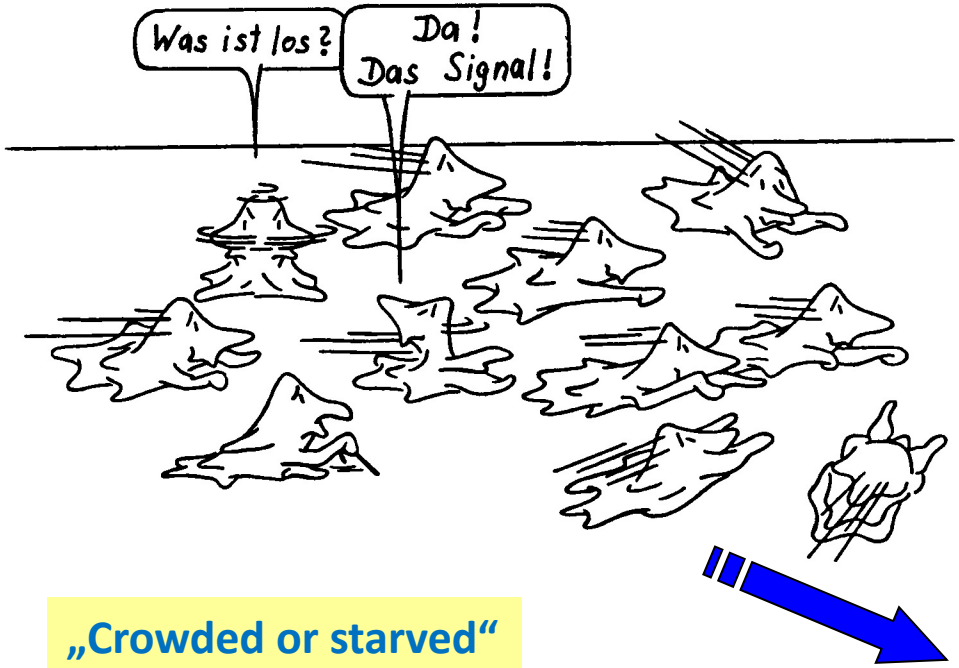
lasI *gfp*

Hentzer et al., Science ; 2002

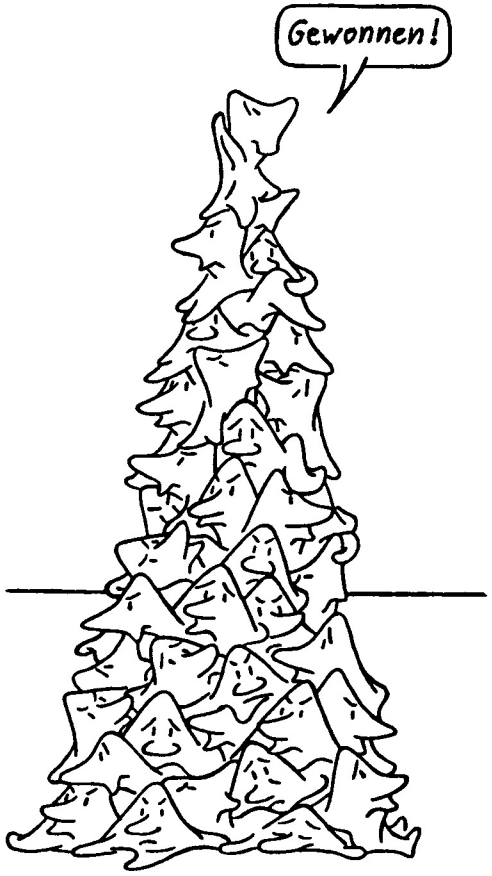
Fruchtkörperbildung:
Stigmatella aurantiaca



(Plaga und Schairer, 1999)

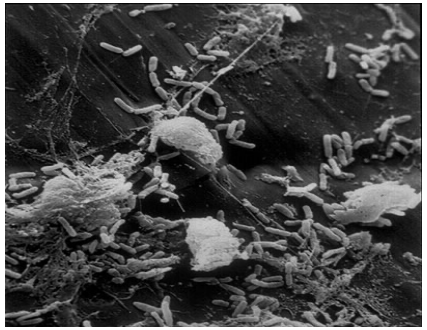


„Crowded or starved“



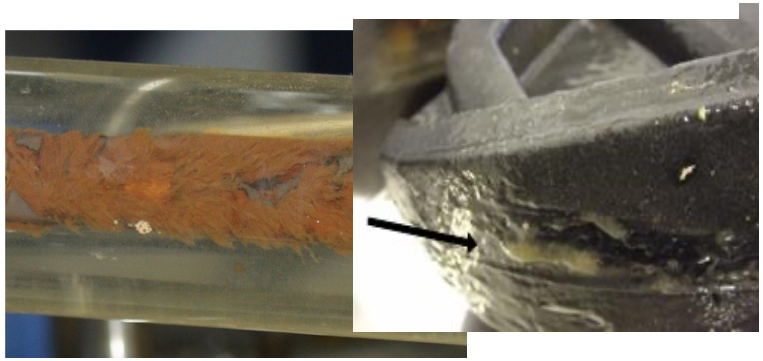
multizellulärer
Fruchtkörper

Biofilm formation is ubiquitous



Intraven. catheter

Paper industry

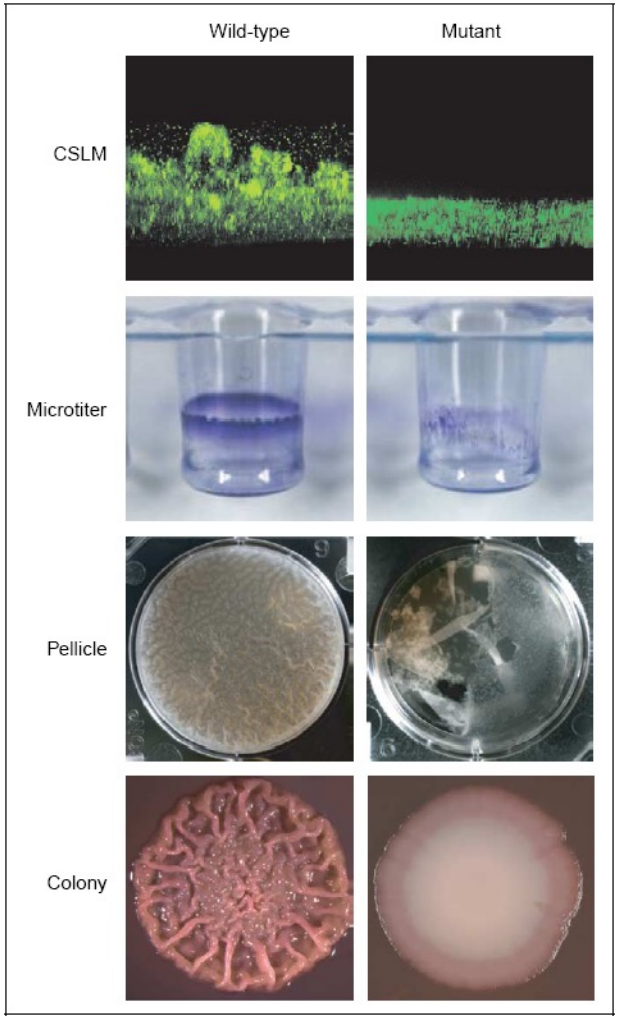


Water treatment & supplying facilities

Silicon implantate

Polyurethane Stents

Household biofilms



Biofilme im Labor

- Flow Cells zusammen mit CSL-Mikroskopie
- Mikrotiterplatten
- Kulturüberstände von Flüssigkulturen (Pellicle/ Kahmhaut)
- Kolonieformen

  Schwimmen und Schwärmen von Mikroorganismen